



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

IZOLACE PLASMIDOVÉ DNA Z BAKTERIÍ A JEJÍ TRANSFEKCE DO BUNĚČNÉ LINIE HEK293

PLASMIDE DNA ISOLATION FROM BACTERIA AND TRANSFECTION TO HEK293 CELL LINE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Klára Měsíčková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Ondřej Svoboda

BRNO 2016

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor **Biomedicínská technika a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Klára Měsíčková

ID: 147483

Ročník: 3

Akademický rok: 2015/16

NÁZEV TÉMATU:

Izolace plasmidové DNA z bakterií a její transfekce do buněčné linie HEK293

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Seznamte se s kultivací buněčné linie DH5 α a její úpravou v kompetentní buňky. 2) Nastudujte možnost vpravování plasmidové DNA do takto upravených buněk a následné možnosti izolace plasmidové DNA. 3) Seznamte se s kultivací buněčných linií HEK293 a možnostmi transfekce těchto buněk plasmidovou DNA. 4) Na dané oblasti sestavte odpovídající literární rešerši. 5) Proveďte úpravu bakterií, amplifikaci, izolaci a pokusnou transfekci dostupných plasmidů označených různými fluorescenčními sondami. 6) Vhodným způsobem zhodnoťte úspěšnost izolace a transfekce DNA. 7) Dosažené výsledky důkladně diskutujte.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] DESALLE, R., GIRIBET, G. and WHEELER, W. Techniques in molecular systematics and evolution. Boston: Birkhäuser, 2002, 407 p. ISBN 08-176-6257-X.

[2] KIM, T. K. and EBERWINE, J. H. Mammalian cell transfection: the present and the future. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2010, vol. 397, issue 8, p. 3173-3178.

Termín zadání: 8.2.2016

Termín odevzdání: 27.5.2016

Vedoucí práce: Ing. Ondřej Svoboda

Konzultant bakalářské práce:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D., předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci na téma *Izolace plasmidové DNA z bakterií a její transfekce do buněčné linie HEK293* jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této bakalářské práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne

.....

(podpis autora)

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla srdečně poděkovat vedoucímu práce Ing. Ondřeji Svobodovi za trpělivé vedení a cenné rady při vypracovávání této bakalářské práce.

V Brně dne

.....

(podpis autora)

Abstrakt

Izolace plasmidové DNA je v mikrobiologii důležitou a často využívanou metodou. Samotné izolaci předchází příprava bakteriálních kompetentních buněk a amplifikace plasmidů. V této práci jsou plasmidy CHR2, ASAP1, ASAP-3, ASAP-5 a K_{ir}2.1. nejprve amplifikovány v bakteriích E.Coli kmenu DH5α a poté metodou fenol-chloroformové extrakce izolovány. K určení správnosti izolace slouží gelová elektroforéza a transfekce do buněčné linie HEK293.

Klíčová slova

Plasmid, izolace DNA, transfekce, HEK293

Abstract

The isolation of plasmid DNA is an important and often used method in microbiology. The isolation itself is preceded by preparation of bacterial competent cells and by amplification of the plasmids. In this stage, plasmids CHR2, ASAP1, ASAP-3, ASAP-5 and K_{ir}2.1. are first amplified in E.Coli bacteria of the DH5α strain and then isolated through the method of phenol-chloroform extraction. Gel electrophoresis and transfection to cellular line HEK293 are used for determining the correctness of the isolation.

Keywords

Plasmid, DNA isolation, transfection, HEK293

MĚSÍČKOVÁ, K. *Izolace plasmidové DNA z bakterií a její transfekce do buněčné linie HEK293*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2016. 42 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Ondřej Svoboda.

Obsah

Seznam obrázků	7
Seznam tabulek	8
Úvod	9
1 Teoretická část.....	10
1.1 DNA.....	10
1.2 Plasmidy	12
1.3 Escherischia Coli	14
1.3.1 DH5 α	15
1.4 Izolace plasmidové DNA.....	16
1.4.1 Fenol-chloroformová extrakce	17
1.4.2 Adsorpční kolonky	17
1.4.3 Magnetické částice	18
1.5 Gelová elektroforéza.....	19
1.6 Transfekce buněk.....	20
1.6.1 Transfekční metody.....	21
1.6.2 Buněčná linie HEK293.....	22
2 Experimentální část	23
2.1 Metody.....	23
2.2 Zhodnocení výsledků.....	26
2.2.1 Analýza gelovou elektroforézou	27
2.2.2 Transfekce	29

Závěr.....	32
Literatura	33
Seznam zkratek	36
Seznam příloh.....	37
Příloha A	38

Seznam obrázků

Obrázek 1: Struktura DNA [4]	11
Obrázek 2: Klonovací vektor [5]	12
Obrázek 3: Escherischia Coli [8]	14
Obrázek 4: Gelová elektroforéza [13]	19
Obrázek 5: Schéma stabilní transfekce (A) a přechodné transfekce (B) [16]	20
Obrázek 6: Buněčná linie HEK293 [17]	22
Obrázek 7: Gelová elektroforéza vzorků č. (zleva) 3, 8, 10, 11, 12, 14 (po 60ti min).....	27
Obrázek 8: Gelová elektroforéza vzorků č. (zleva) 2, 5, 6, 7, 13, 15 (po 60ti min).....	28
Obrázek 9: Gelová elektroforéza vzorků č. (zleva) 1, 4, 9, 16, 17, 18 (po 60ti min).....	28
Obrázek 10: Transfekce, vzorky č. 9, 13, 14, 18- ASAP1; vzorky č. 8, 15- ASAP-3, vzorek č. 10- ASAP-5; vzorky č. 2, 4, 5, 7, 11, 12- CHR2; vzorky č. 1, 3, 6, 16, 17- Kir 2.1 (po 72 h)	30

Seznam tabulek

Tabulka 1: Izolované plasmidy 26

Tabulka 2: Tabulka koncentrací a vkládaného množství plasmidů k buňkám při transfekci .. 26

Úvod

Tato práce se zabývá tématem izolace plasmidové DNA z bakterií a její následnou transfekcí do buněčné linie HEK293. V teoretické části práce jsou zpracovány základní informace a fakta o DNA, plasmidech, bakteriích jako hostitelských organismech a metodách izolace, nutná k pochopení navazující experimentální části.

Cílem práce je, seznámit se s metodami izolace a transfekce plasmidové DNA a následné využití metody fenol-chloroformové extrakce pro její izolaci.

Nukleové kyseliny (DNA, RNA) pro nás znamenají nejvýznamnější bioinformační složku buněčných i nebuněčných soustav. Za jejich objev (první izolaci) vděčíme švýcarskému biochemikovi Friedrichovi Miescher (1869-1872), který pracoval v institutu Hoppe-Seillera ve Vídni. Když prováděl chemickou analýzu leukocytů pocházejících z hnisu, zjistil, že základní složkou buněčných jader jsou organické látky bohaté na fosfor a nazval je nukleové kyseliny (nukleus= jádro). Ovšem biologické funkce těchto nově objevených organických látek, byly objasněny až 75 let po objevu Friedricha Miescher. [1]

V letech 1952- 1966 byla objasněna struktura DNA, popsány procesy transkripce, translace a Nirenberg, Ochoa a Khorana rozluštili genetický kód. Po letech objevování následovalo období klidu, až do doby tzv. revoluce v experimentální biologii (1971-1973), kdy byly vyvinuty zcela nové metody realizující dříve neproveditelné experimenty. Jedná se o metody technologie rekombinantní DNA nebo také genové inženýrství a jejich hlavním předmětem bylo klonování genů. [2]

Izolace plasmidové DNA se v genovém inženýrství velmi často využívá, protože plasmidová DNA má schopnost tvořit rekombinantní proteiny, které mohou být začleněny do buněk jiného organismu a tam replikovány.

Pro amplifikaci plasmidové DNA je využíváno bakteriálních linií, ve kterých se vpravená plasmidová DNA namnoží a následně izoluje. Izolací se získá kruhová molekula plasmidové DNA, která může sloužit jako předloha pro řadu definovaných membránových konstruktů. V experimentální části této práce byly pro izolaci plasmidové DNA použity proteiny channelrhodopsin-2 (CHR2), activated sensor of action potentials (ASAP1, ASAP-3, ASAP-5) a draselný kanál $K_{ir} 2.1$. Gelovou elektroforézou a transfekcí je získaná DNA otestována.

K transfekci se v této práci jako modelový organismus využívá buněčná linie HEK293 a to z důvodu její jednoduché transfekce.

1 Teoretická část

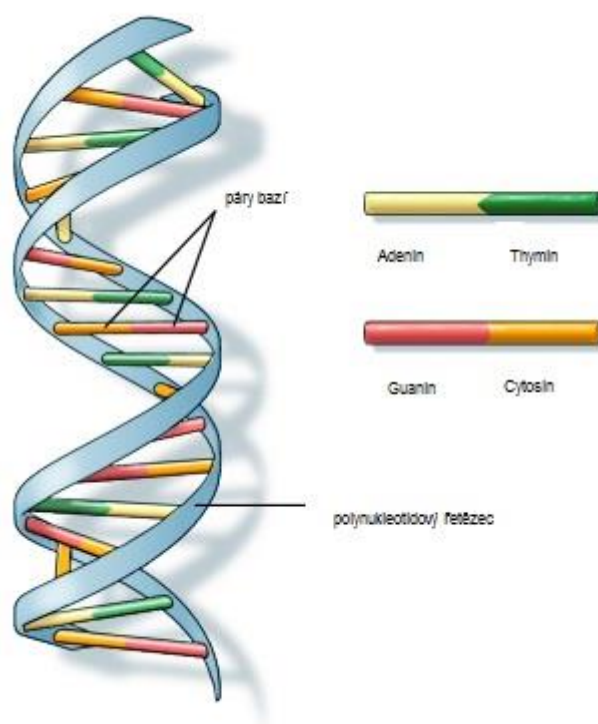
Teoretickou část této práce tvoří jednotlivé kapitoly, postupně odhalující fakta daného tématu. Kapitoly jsou uspořádány od základních informací o DNA a její plasmidové formě přes informace o bakteriích *Escherichia Coli*, které slouží v této práci jako hostitelský organismus pro plasmidy k jejich naklonování. Důležitou kapitolou je samotná izolace plasmidové DNA z bakterií se zaměřením na fenol-chloroformovou metodu a následné metody zhodnocení kvality provedené izolace, jimiž jsou gelová elektroforéza a kontrolní transfekce do buněčné linie HEK293.

1.1 DNA

Základní biologická úloha deoxyribonukleové kyseliny (DNA) je ukládání a přenos genetické informace. U eukaryotických buněk se nachází v jádře na chromozomech (malé množství je uloženo v mitochondriích) a u prokaryotických buněk, které nemají jádro, se DNA nachází v podobě hlavního cirkulárního chromozomu a tzv. extrachromozomálních genetických prvků – plasmidů, o kterých je pojednáno v kapitole 1.2.

Informace je v DNA uložena jako kód sestávající ze čtyř chemických bází- adenin (A), guanin (G), cytosin (C) a thymin (T). A a G jsou báze purinové a C a T báze pyrimidinové. Lidská DNA se skládá cca ze 3 mld bází a více než 99% těchto bází je pro všechny lidi stejné. Jednotlivé báze tvoří mezi sebou dvojice- páry a to na základě komplementarity adenin s thyminem a cytosin s guaninem, což dalo za vznik jednotce bp (base pairs- párů bází). Vazba mezi cytosinem a guaninem je pevnější, jelikož ji tvoří tři vodíkové můstky, kdežto adenin s thyminem pojí dva vodíkové můstky. K celkové stabilitě molekuly pomáhají van der Waalsovy síly mezi sousedními bázemi.[3]

Ke každé bázi je připojena pěti uhlíková molekula cukru (DNA- deoxyribóza, RNA- ribóza) a molekula fosfátu. Dohromady tyto tři části tvoří nukleotid. Jednotlivé nukleotidy jsou uspořádány ve dvou dlouhých vláknech, polynukleotidových řetězcích, která tvoří tzv. dvoušroubovici (Obrázek 1). [3]



Obrázek 1: Struktura DNA [4]

Důležitou vlastností DNA je schopnost replikace nebo vytváření svých kopií. Každé vlákno dvoušroubovice může sloužit jako vzor pro duplikaci sekvence bází. Tato vlastnost je důležitá při dělení buněk, protože každá nová buňka musí dostat přesnou kopii DNA původní buňky. [4]

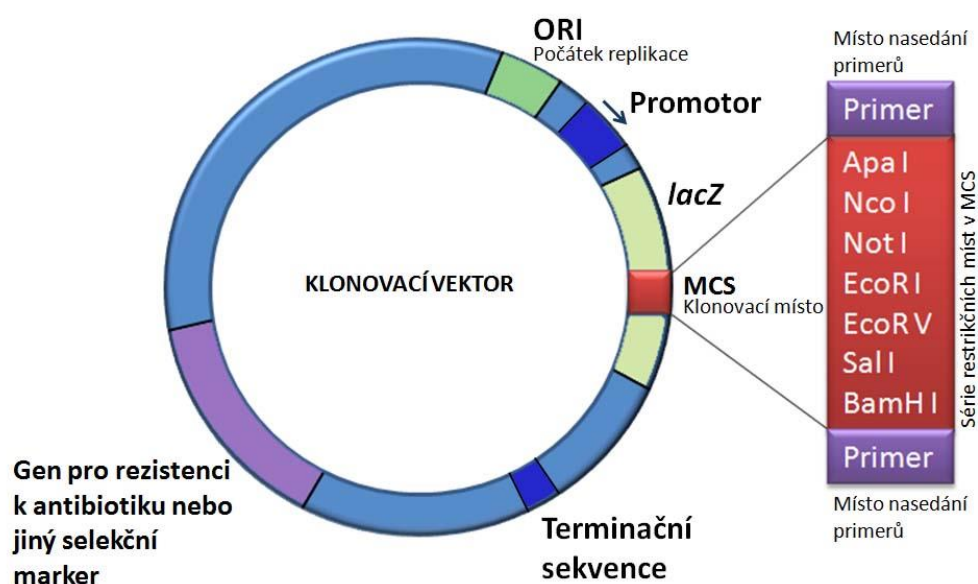
Každá sekvence DNA, která obsahuje instrukce k tvorbě proteinů, je známá jako gen. Nejmenší lidský gen (kódující jistý histon) tvoří pouze 500 nukleotidů a největší gen tvoří 2,5 milionu nukleotidů (gen kódující bílkovinu dystrofin). Tvorba proteinů se děje ve dvou krocích. Prvním dějem, kdy se informace z DNA přepíše do zprostředkující molekuly nazývané mRNA (messenger ribonucleic acid), je transkripce. Dalším krokem je translace, což znamená překlad informací z mRNA do „jazyka“ aminokyselin, které jsou stavebními kameny bílkovin. [3]

1.2 Plasmidy

Plasmidová DNA neboli plasmidy, jsou malé (několik až několik set kilobází), cirkulární, extrachromozomální molekuly DNA, jež mají schopnost samostatné replikace. Nachází se v cytoplazmě prokaryotických a některých eukaryotických organismů. Na konci této kapitoly jsou vypsané plasmidy, které jsou v experimentální části izolovány.

Každý plasmid je v buňce zastoupen určitým počtem svých kopií a může se v nich nacházet doplňková genetická informace, jako např. schopnost rezistence k antibiotikům. Tato schopnost umožňuje přežití organismu v normálně toxických koncentracích antibiotik (chloramfenikol či ampicilin) a slouží jako tzv. selekční marker, který je důkazem, že bakterie obsahují daný plasmid. [2]

V genetickém inženýrství jsou plasmidy využívány pro experimentální manipulace s geny a slouží jako tzv. klonovací vektory k přenosu genů (Obrázek 2).



Obrázek 2: Klonovací vektor [5]

Klonovací vektor nese nejméně jednu sekvenci DNA, jež může v hostitelském organismu (bakterii) fungovat jako počátek replikace (ori). Díky tomu se plasmidy mohou v buňce množit nezávisle na hlavním hostitelském (bakteriálním) chromosomu. [2] Druhým důležitým místem klonovacího vektoru je selekční marker, který právě zajišťuje buňkám s vneseným vektorem výhodu nad buňkami, které ho neobsahují. Výhoda spočívá např. v rezistenci k antibiotikům, o čem již bylo pojednáno výše a docílí se tím toho, že po vysetí buněk na medium porostou pouze buňky obsahující plasmid s genem rezistence. Třetí základní částí klonovacího vektoru je klonovací místo (MCS- multiple cloning site), které

obsahuje velké množství míst rozpoznávaných restričními endonukleázami. Což umožňuje „otevření“ plasmidu v tomto místě a vložení cizí DNA. Součástí vektoru bývá také gen LacZ neboli modro-bílá selekce. Je to způsob, jež rozliší buňky obsahující plasmid s vloženou cizí DNA od buněk s plasmidem bez cizí DNA. [5]

Channelrhodopsin-2: CHR2 je protein příbuzný rodopsinům a je zodpovědný za vnímání světla v rohovce, jedná se o světlem aktivovaný transmembránový protein. Rodopsin je složen ze složky absorbující světlo (chromofor)- retinalu a bílkovinného nosiče- opsinu. Retinal absorbuje dopadající fotony světla a dochází k izomerizaci ze základní cis formy na all-trans formu. Tato změna konformace spouští další kaskádu děju a jejím výsledkem je, že jsme schopni CHR2 v buňkách detekovat pomocí navázané YFP sondy a UV zářením o vlnové délce 560 nm.[18]

ASAP1: Accelerated Sensor of Action Potentials je uměle připravený sensor akčních potenciálů u savčích buněk a obsahuje zelený fluorescenční protein, který reaguje na membránový potenciál. Tento plasmid detekuje jednotlivé akční potenciály buněk až do frekvence 200 Hz. [19] ASAP1 jsme schopni po ozáření UV světlem o vlnové délce 540 nm v buňkách detekovat díky navázané GFP sondě.

K_{ir}2.1: jedná se o vnitřně usměrněný iontově selektivní draslíkový kanál, který se nachází v membráně buněk. Tento draslíkový kanál napomáhá stabilizovat klidový membránový potenciál buněk tím, že usnadňuje průchod kladně nabitých částic do buňky. Kanály K_{ir}2.1 se vyskytují u různých typů buněk (např. srdeční a ledvinové buňky, endoteliální buňky, neurony, leukocyty). [20] Tento plasmid obsahuje červený fluorescenční protein mCherry s maximem excitační vlnové délky při 587 nm.

1.3 *Escherischia Coli*

Bakterie *E.Coli*, z čeledi *Enterobacteriaceae* patří k nejprostudovanějším modelovým organismům. Protože je pro řadu experimentálních technik zapotřebí použití hostitelského organismu, je *E.Coli* často nejvhodnějším adeptem. V experimentální části práce byla tato bakterie použita jako modelový organismus pro amplifikaci plasmidové DNA. Konkrétně byl použit kmen DH5 α , o kterém je pojednáno níže v kapitole 1.3.1.

Kmeny *Escherischia coli* jsou gramnegativní, jednobuněčné bakterie, tzv. koliformní tyčky, díky bičíku schopny pohybu a patří k nejčetnějším bakteriím aerobní saprofytické střevní mikroflóry člověka a zvířat. Svůj název získaly dle jména svého objevitele, německého lékaře Theodora Escherische, jež je v roce 1885 poprvé izoloval a charakterizoval. [6]

Fyziologicky jsou tyto organismy univerzální s velmi dobrou adaptační schopností na různá prostředí. Mohou růst v médiu s glukózou jako jediná organická složka. Za anaerobních podmínek se rozmnožují pomocí fermentace, kdy je konečným produktem směs kyseliny a plynu nebo pomocí anaerobního dýchání, kde v dýchacím řetězci figurují jako akceptor elektronů látky jiné než kyslík (např. NO₃, NO₂, fumarát). [7]

E.coli je v měřítku hostitelských organismů organismus skýtající největší množství různých klonovacích vektorů. Přestože se jedná o prokaryotní organismus, je v používání při studiu eukaryotních genů stále na nejvyšší příčce.



Obrázek 3: *Escherischia Coli* [8]

Bakterie je možné bez obtíží kultivovat v tekutém médiu. Kultivační prostředí, obsahující vyváženou směs nezbytných živin, umožňuje růst a efektivní dělení bakterií.

Médium, jehož komponenty jsou známy, se nazývá definované médium a příkladem je médium M9. Obsahem tohoto média je směs anorganických látek, základní prvky jako jsou dusík, hořčík, vápník a glukóza. Dle druhu bakterie se ještě přidávají další růstové faktory (stopové prvky, vitamíny). Tohoto typu média se využívá, jestliže je nutné, aby bakterie rostly za přesně regulovaných podmínek. Pokud se bakterie pěstují pouze za účelem izolace DNA, postačí druhý typ média. [2]

Druhým typem média je komplexní neboli nedefinované médium Luria-Bertani (LB) a jeho kvalitativní a kvantitativní složení není zcela známo. Což je způsobeno tím, že dvě složky, trypton a kvasničný extrakt, jsou složité směsi neznámých chemických sloučenin. Toto médium nepotřebuje pro kultivaci široké škály bakteriálních druhů již žádné další doplňky. Trypton je zdrojem aminokyselin a malých peptidů a kvasničný extrakt poskytuje bakteriím dusík, cukry a anorganické i organické látky. [2]

Buňky E. Coli se v LB médiu při teplotě 37°C dělí přibližně každých 20 minut, dokud hustota suspenze nedosáhne maximální hodnoty kolem $2-3 \times 10^9$ buněk/ml. [2]

1.3.1 DH5α

Tento kmen E.Coli byl vyvinut D. Hanahanem pro používání v laboratořích při klonování. DH5α je klonovací kmen s více mutacemi, které umožňují transformaci s vysokou účinností.[9]

Bylo prokázáno, že hostitelský kmen má významný vliv, jak na výnos, tak na kvalitu plasmidové DNA použité pro sekvenování. Kmen DH5α má stabilně největší výtěžky kvalitní plasmidové DNA a to hlavně díky tomu, že izolovaná plasmidová DNA nepodléhá degradaci při fenol-chloroformové extrakci. Z tohoto důvodu je kmen DH5α vhodným typem hostitelských buněk pro izolaci plasmidové DNA. [10]

1.4 Izolace plasmidové DNA

Vysoce kvalitní izolace biologicky aktivní plasmidové DNA je v oblasti biotechnologie důležitá. Poptávka po účinných výrobních metodách plasmidové DNA je vysoká pro své široké využití v genové terapii, DNA sekvencích, genových vakcínách atd. Brzy byla vyvinuta tradiční fenol-chloroformová metoda izolace, o které je pojednáno v kapitole 1.4.1. Postupem času docházelo ke zdokonalování izolace DNA a s tím k vyvíjení dalších metod jako např. izolace pomocí adsorpčních kolonek nebo magnetických částic. V experimentální části této práce byla použita klasická fenol-chloroformová extrakce. [11]

Proces izolace DNA z buněk bakteriálních kultur lze rozdělit do následujících základních fází:

- růst bakteriální kultury a následná sedimentace buněk
- narušení buněk a uvolnění jejich obsahu
- odstranění všech složek kromě DNA
- zahuštění výsledného roztoku DNA

Bakterie kultivované v tekutém médiu je potřeba získat v co nejmenším objemu. Centrifugací při nízké rychlosti dojde k usazení bakterií na dně zkumavky a kultivační médium lze slít. Získané bakteriální buňky je potřeba narušit, aby se uvolnily všechny buněčné součásti. Buněčnou stěnu lze narušit technikou fyzikální (mechanické rozrušení) nebo technikou chemickou (rozrušení chemickými činidly). [2]

K narušení buněčné stěny E.Coli pro izolaci DNA se obvykle používají chemická činidla lysozym, EDTA (ethylendiamintetraacetate) či jejich kombinace a přidává se ještě detergent, např. SDS (dodecyl sulfát sodný). Detergenty odstraňují molekuly lipidů, čímž narušují buněčné membrány. Po docílení lyze buněk se centrifugací odstraní nerozpustné buněčné zbytky (např. zlomky buněčné stěny) a zůstane čirý buněčný extrakt. [2]

Kromě DNA obsahuje získaný buněčný extrakt také proteiny a RNA. Pro vyizolování čisté DNA se používají různé metody, některé z nich jsou blíže popsány níže. RNA je možné snadno odstranit enzymaticky, pomocí ribonukleázy, která molekuly RNA degraduje na ribonukleotidové podjednotky, jež jsou v dalších fázích odstraněny. [2]

Po zbavení se všech kontaminant (proteinů, RNA) ve vzorku, se DNA vysráží pomocí alkoholu (používá se etanol nebo isopropanol). Centrifugací poté sraženina sedimentuje a následně se resuspenduje v přiměřeném objemu pufru nebo vody. [2]

Získání čisté plasmidové DNA je nutné, pokud mají být plasmidy použity jako klonovací vektory. Je nezbytná separace plasmidů od bakteriální chromozomální DNA. Metody k oddělení plasmidové DNA od chromozomální jsou založeny na vzájemných fyzikálních rozdílech.

Plasmidy dosahují maximálně pouze 8% velikosti chromozomu bakterií, díky čemu je možné, pomocí technik oddělování malých molekul DNA od velkých, získat čistou plasmidovou DNA. Ovšem také techniky separace kružnicových od lineárních molekul povedou k získání čisté plasmidové DNA, jelikož chromozomy se během purifikace buněčného extraktu rozpadají na lineární fragmenty a plasmidy zůstávají v kruhové formě.[2]

1.4.1 Fenol-chloroformová extrakce

Jedná se o klasickou metodu odstranění proteinů z buněčných lyzátů, která využívá organických rozpouštědel. Tato metoda poskytuje dobré výsledky, je ekonomicky nenáročná, avšak oproti jiným metodám zabere více času a velkou roli zde hraje lidský faktor (výsledky jsou závislé na přesnosti provedení). [12]

Směs fenolu a chloroformu (1:1) je řádně roztřepána s buněčným lyzátem. Chloroform je nemísitelný s vodou, jelikož je to organické rozpouštědlo a proto se po centrifugování směs rozdělí na vodnou a organickou fázi. Vodná fáze je lehčí, takže tvoří horní část a obsahuje DNA. Spodní, organická fáze je tvořená fenolem. Na rozhraní těchto dvou fází vzniká bílý prstenec, který je tvořen vysráženými proteiny. Pro zajištění dokonalého odstranění proteinů se extrakce s vodnou fází až několikrát opakuje. Pomocí koncentrovaného etanolu nebo isopropanolu dojde k vysrážení DNA a následnou centrifugací získáme pelet obsahující danou plasmidovou DNA. Supernatant je následně odstraněn a k dalšímu uchování je získaná izolovaná DNA rozpuštěna ve vhodném pufru. [12]

1.4.2 Adsorpční kolonky

Tato metoda je považována za rychlou, jednoduchou, s vysokými výtěžky a na jejím principu jsou založeny komerční kolonkové kity, které slouží pro rutinní extrakce DNA. Metoda je založena na jednoduchém procesu vazby, promytí a uvolnění. [12]

Je zde využíváno schopnosti NK, za přítomnosti chaotropní soli, adsorbovat se na povrch silikátu vyrobeného z oxidu křemičitého. Při adsorpci hraje roli několik faktorů: iontová síla, pH roztoku a typ NK. Silikát má silně polární charakter, což umožňuje adsorpci NK. Kolonka s navázanou DNA je několikrát promyta vodou či eluačním pufrem a je okamžitě připravena na použití pro další zkoumání. [12]

1.4.3 Magnetické částice

Metoda, založená na použití magnetických částic je poměrně snadná a výsledkem je DNA nekontaminovaná RNA nebo proteiny.

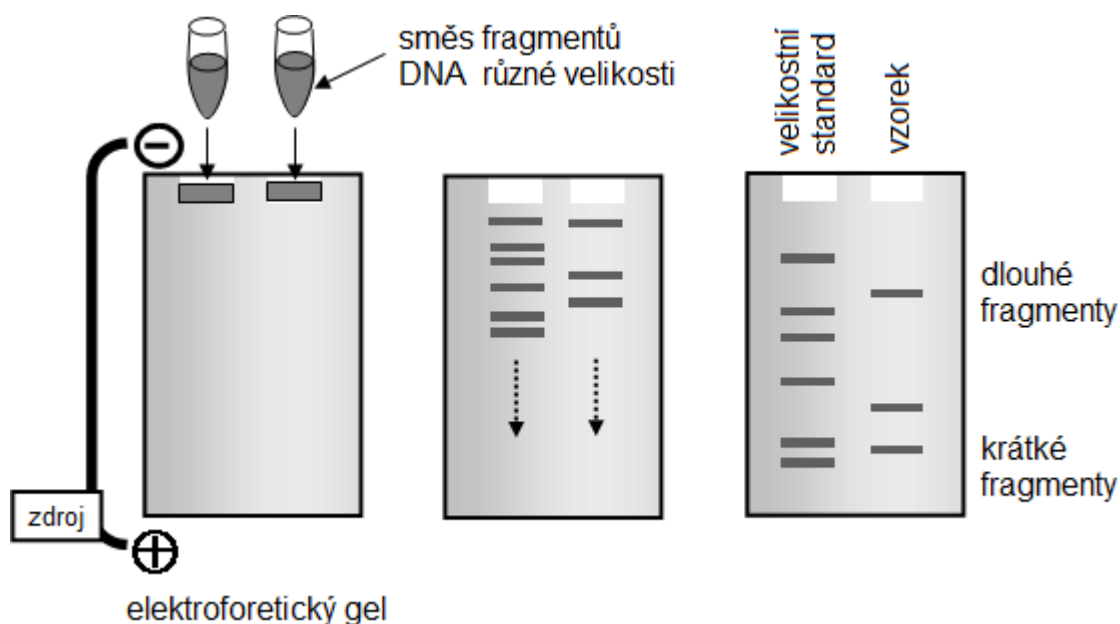
Magnetické částice jsou útvary kulovitěho tvaru o průměru 5 nm- 100 μ m. Jádro částic je tvořeno nejčastěji maghemitem, magnetitem nebo i zlatem. Jejich povrch je upraven tak, aby bylo možné navázání nukleových kyselin.

Izolace DNA založená na použití magnetických částic funguje tak, že se ke vzorku buněčného lyzátu přidají magnetické částice a cílené molekuly NK se naváží na jejich povrch. Zkumavka se přiloží do blízkosti působení magnetu a magnetické částice přilnou ke stěně zkumavky. Zbylý roztok se odstraní a promýváním se uvolní NK do příslušného pufru.[12]

1.5 Gelová elektroforéza

Separace molekul gelovou elektroforézou, je technika založená na rozdílu elektrického náboje molekul ve směsi. Molekuly DNA jsou nositelkou negativního náboje, tudíž v elektrickém poli putují směrem k pozitivnímu pólu (anodě). Migrační rychlost je závislá na tvaru molekuly a na jejím poměru náboje k hmotě. Tato separační metoda se používá při izolaci DNA jako ověření úspěšnosti izolace.

Při provádění elektroforézy se používá gel vyrobený z agarózy, polyakrylamidu nebo z jejich směsi. Gel vytvoří pórovitou síť, kterou molekuly DNA na cestě k anodě musí projít. Platí zde pravidlo, že čím je molekula menší, tím rychleji gelem putuje. Takže na gelu dochází k oddělení molekul DNA dle velikosti. V přítomnosti DNA fragmentů různých velikostí se v gelu objeví řada proužků. [13]



Obrázek 4: Gelová elektroforéza [13]

Gel je umístěn v elektroforetické vaně, ve které je obsažen elektrolyt (např. TBE pufr). Ke vzorkům DNA se přidá tzv. vkládací pufr, který zajistí, aby vzorky DNA klesly do jamek v gelu, a dodá vzorkům tmavé zbarvení pro snadnou kontrolu migrace vzorků v gelu. Do jedné z jamek se vnáší velikostní marker o definované velikosti jednotlivých fragmentů, pro přesnější odhad velikosti DNA fragmentů ze vzorků. Dále se přidává barvivo např. ethidiumbromid nebo SYBR Green, které se váže na DNA a umožní v transluminátoru UV zářením zviditelnit fragmenty. [13]

1.6 Transfekce buněk

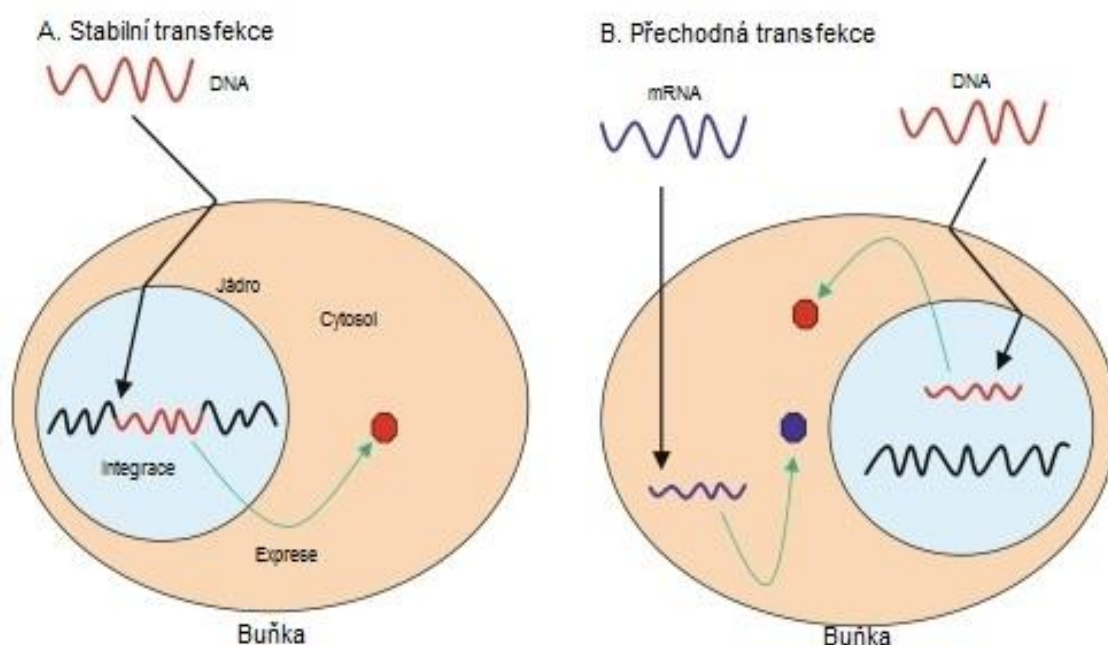
Transfekce je analytický nástroj, který umožňuje studium funkce genů a genových výrobků buněk. Jedná se o metodu začlenění cizí nukleové kyseliny (nejčastěji plasmidů) do eukaryotické buňky za vzniku geneticky modifikovaných buněk. Hlavním účelem transfekce je studium funkce genů nebo genových produktů pomocí stimulace nebo inhibice exprese určitých genů. Metody transfekce jsou klasifikovány do tří skupin: biologické, chemické a fyzikální. Dále se dělí na stabilní a přechodnou v závislosti na existenci začleněného genetického materiálu v buňkách. [16]

Stabilní transfekce

Při stabilní transfekci je vložený genetický materiál začleněn do genomu hostitelské buňky a jeho exprese probíhá jakožto exprese sjednoceného genomu. Genová exprese u stabilní transfekce přetrvává i po dělení buněk. [16]

Přechodná transfekce

Na rozdíl od stabilní transfekce nedochází k začlenění genetického materiálu do genomu hostitelské buňky. K expresi dochází hned po proniknutí nukleové kyseliny do jádra a zároveň dochází k syntéze rekombinantního proteinu, který je možné po pár hodinách detekovat. [16]



Obrázek 5: Schéma stabilní transfekce (A) a přechodné transfekce (B) [16]

Na Obrázek 5 jsou zobrazeny rozdíly mezi stabilní a přechodnou transfekcí. U stabilní transfekce (Obrázek 5A) cizorodá DNA (červená) projde přes buněčnou a jadernou membránu do jádra buňky a začlení se do jaderného genomu (černá) a následuje exprese sjednoceného genomu. U přechodné transfekce (Obrázek 5B) DNA pronikne do jádra buňky, ale nedojde k začlenění do genomu buňky (společně může proniknout do cytosolu i mRNA).

1.6.1 Transfekční metody

Pro transfekci buněk bylo vyvinuto několik metod. Příslušná metoda se volí dle typu buněk (buněčné linie), účelu transfekce a účinnosti. Ideální metoda by měla mít vysokou účinnost transfekce, nízkou toxicitu, minimální účinky na normální fyziologii buňky a musí být snadno použitelná a reprodukovatelná. Rozdělují se na biologické, chemické a fyzikální.

Biologické metody

Nejčastěji používanou metodou v klinickém výzkumu je virem zprostředkovaná transfekce (známá jako transdukce), proto se také pro biologické metody používá často název virální metody. Transfekce pomocí viru je vysoce efektivní, používají se adenoviry a retroviry. Tzv. virové vektory jsou integrovány do hostitelského genomu a dochází k expresi integrované DNA v hostitelské buňce. Sjednocená DNA se replikuje a oddělují se dceřinné buňky, které umožňují udržitelnou expresi transgenu. [16]

Chemické metody

Chemické metody transfekce jsou nejpoužívanější v současném výzkumu. Principem chemických metod je překonání záporného náboje lipofilní membrány buněk. Je zapotřebí vytvořit komplex přenášené DNA a transfekční látky. Celý komplex přejde (pravděpodobně pomocí endocytózy a fagocytózy) do cytoplasmy hostitelských buněk, kde se působením lysozomů a endozomů začne rozkládat, přenášená DNA přejde do jádra a začne se exprimovat. Jako transfekční látky se běžně používají fosforečnan vápenatý, kationový polymer, PEI (polyethylenimin) nebo kationtové lipidy. Účinnost chemických metod je značně závislá na různých faktorech (např. pH roztoku, stav buněčné membrány), předností však je nízká cytotoxicita či žádná mutageneze. [16]

Fyzikální metody

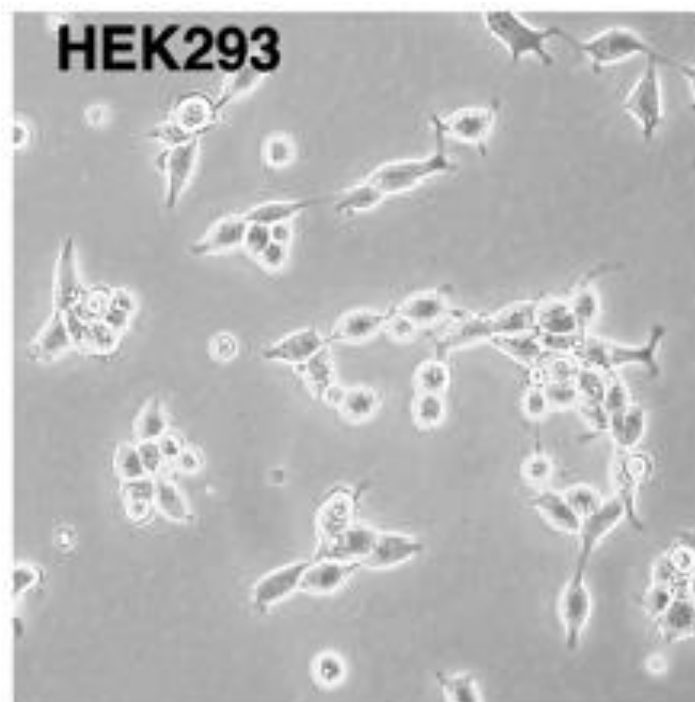
Fyzikální metody využívají k vpravení DNA do buňky různé fyzikální nástroje. Tyto metody zahrnují mikroinjekce (zařízení gene gun), elektroporaci, transfekci na bázi laseru, využití magnetických částic nebo také využití ultrazvuku a magnetického pole. Z fyzikálních metod je nejvíce využívanou elektroporace, protože je snadná, rychlá a je schopna

transfekovat velký počet buněk v krátké době (ovšem musí být stanoveny optimální podmínky elektroporace). [16]

1.6.2 Buněčná linie HEK293

Buněčná linie HEK293 (human embryonic kidney 293) jsou lidské embryonální buňky ledvinového epitelu. Původní buňky HEK293 byly poprvé získány z ledvin lidského embrya a byly transformovány virovou DNA adenoviru 5. Linii kultivoval ve své laboratoři v Holandsku vědec Alex Van der Eb v 70. letech a transformaci provedl Frank Graham. Označení číslem 293 poukazuje na 293. transformační pokus, ze kterého linie vzešla. [14]

Lidské embryonální buňky ledvinového epitelu jsou v biomedicínském výzkumu často používané vzhledem ke svému širokému využití. Buněčné linie jsou snadno kultivovatelné, mají schopnost rychlého množení a poměrně snadno se transfekují. Příkladem použití buněk HEK293 je studie účinků léků na sodíkové kanály, analýza interakcí mezi dvěma proteiny nebo výroba biologicky aktivních proteinů, které se špatně produkují v prokaryotických buňkách. Dále se také využívají k výrobě exogenních proteinů nebo virů pro farmaceutický a biomedicínský výzkum. [15]



Obrázek 6: Buněčná linie HEK293 [17]

2 Experimentální část

Experimentální část práce se zabývá popisem užitých metod a postupů s následným zhodnocením a diskuzí výsledků, kterých bylo dosaženo.

Náplní experimentální práce byla izolace plasmidů, konkrétně proteinu CHR2, ASAP1, ASAP-2, ASAP-3 a Kir2.1, metodou fenol-chloroformové extrakce. Provedeno bylo celkem 18 izolací.

2.1 Metody

Metoda izolace plasmidové DNA, je proces, který obnáší přípravu kompetentních buněk, transformaci buněk a samotnou izolaci DNA. Pro izolaci plasmidové DNA byla použita metoda fenol-chloroformové extrakce.

Amplifikace

Pro amplifikaci zmíněných plasmidů byly zvoleny bakteriální buňky E.Coli kmenu DH5 α . Buňky bakterií musely být upraveny, aby byly schopny přijmout plasmidovou DNA-kompetentní buňky.

Kompetentní buňky byly připraveny kultivací 250 ml SOB media s 1 ml nekompetentních buněk při teplotě 37°C. Po 16ti hodinách byl centrifugací (5000 otáček, 10 min) získán buněčný pelet, který byl následně rozpuštěn v 80 ml pufru CCMB80 a inkubován 20 min na ledu. Poté byla opět provedena centrifugace a buněčný pelet rozpuštěn v 10 ml pufru. Již kompetentní buňky byly rozděleny do 0,5 ml zkumavek a pro uchování na další použití zmrazeny na -80 °C.

Následoval krok vpravení plasmidů do kompetentních bakteriálních buněk. 50 μ l kompetentních buněk bylo smícháno s plasmidovou DNA a 20 minut inkubováno na ledu. Poté byly buňky vystaveny teplotnímu šoku 42°C po 1 min, při kterém se destabilizovala cytoplazmatická membrána kompetentních buněk a plasmidy se mohly začlenit. Poté byl k buňkám přidán 1 ml SOC media a na třepačce při 37°C 60 min inkubováno. Po hodinové inkubaci byly buňky naneseny na agarové plotny s ampicilinem a v sušičce při 37°C přes noc kultivovány.

Izolace plasmidové DNA

Buňky byly z agarových ploten seškrábnuty a umístěny do tekutého LB media s přidaným ampicilinem, kde se přes noc při 37°C kultivovaly. Centrifugací (4000 otáček, 10

minut) byl získán pelet, který byl řádným vortexováním resuspendován ve 4 ml roztoku GET. Poté bylo přidáno 8 ml detergentu alkalické-SDS, čímž došlo k alkalické lýze buněčné membrány. Doba působení detergentu nesměla být delší než 3 minuty. Aby se vyrovnalo pH, bylo přidáno 6 ml roztoku KAc, řádně protřepáno a 10 minut inkubováno na ledu. Následnou centrifugací byl získán vodný roztok, obsahující DNA a pelet, který obsahoval zbytky buněk a sražené bílkoviny. Vodný roztok byl přelit do nové zkumavky, rozředěn 16 ml isopropanolu pro vysrážení proteinů a inkubován 15 minut při pokojové teplotě. Pelet, získaný centrifugací (10 minut, 5000 otáček), byl resuspendován v 800 μ l TE pufru, přemístěn do 2 ml zkumavek a umístěn do lázně 65°C na 20 minut. Po zahřátí vzorku bylo přidáno 0,5 μ l RNasy A (pro odstranění RNA) a 30 min při 37°C inkubováno.

V této fázi následuje fenol-chloroformová extrakce pro zbavení se zbylých zbytků proteinů, RNA nebo jiných nečistot. Do roztoku bylo přidáno 300 μ l směsi fenol:chloroform:isoamyl alkohol, 200 μ l 1M Tris (base) a 100 μ l 3M NaAc. Roztok byl řádně protřepán, aby se všechny složky spojily a vložen do mikrocentrifugy (15000 otáček, 3 min). Odstředěním došlo k rozdělení roztoku na 3 fáze. Horní- vodná fáze obsahující DNA, spodní- fenolová fáze a mezi nimi bílý prstenec tvořen proteiny.

Extrakce vodné fáze s 500 μ l chloroform-isoamyl alkoholem byla 2-4x opakována, aby bylo zajištěno úplné odstranění proteinů a zbytků fenolu. Přidáním 1000 μ l isopropanolu byla obsažená DNA vysrážena (30 min, pokojová teplota) a závěrečnou centrifugací (10 min, 15000 otáček) byl získán požadovaný pelet tvořený kruhovou DNA (i lineární). Pro další uchování byl pelet rozpuštěn v příslušném množství (400-1000 μ l) TE pufru.

Gelová elektroforéza

Metoda gelové elektroforézy posloužila ke zjištění úspěšnosti vyizolované plasmidové DNA.

Smícháním agarosy s TAE pufrem, ethidium bromidem (zajišťuje fluorescenci) a následným přivedením k varu byl připraven agarový gel. Gel byl zchlazen a rozlit do forem s hřebínkem, který utvoří potřebné jamky v gelu.

Pro urychlení tuhnutí byl gel vložen do ledničky. Ztuhlý gel se umístí do elektroforetické vany, která je vyplněna TAE pufrem. 2 μ l jednotlivých vzorků plasmidové DNA jsou smíchány s 6 μ l vkladacího pufru a napipetovány do hřebínkem vytvořených jamek v gelu. Do elektroforetické vany je přivedeno napětí (80-100 V) a DNA ze vzorků postupně migruje k anodě. Zhruba po 30ti minutách je agarový gel vložen do transluminátoru, který zobrazí separované fragmenty DNA.

Transfekce

Pro konečné vyhodnocení správnosti izolace plasmidové DNA, byly jednotlivé plasmidy transfekovány do buněčné linie HEK 293. Zvolena byla metoda chemické transfekce s transfekčním reagentem PEI.

Transfekční roztok byl připraven ve zkumavkách následujícím způsobem. Do 110 μ l 150mM NaCl bylo vloženo určité množství plasmidu viz. Tabulka 2 a 6 μ l PEI, poté se roztok 10 minut inkuboval při pokojové teplotě. Jednotlivé transfekční roztoky s 2 ml kultivačního média byly přidány do konfokálních misek k buňkám.

Transfekce byla provedena vícekrát, díky čemuž mohly být vkládané objemy některých pDNA upraveny a získány lepší výsledky. V případě posledních tří vzorků (16, 17, 18) nebyla změřena koncentrace pDNA, jelikož byly dodatečně doizolovány a přístroj pro měření koncentrace se nenachází v prostorách laboratoře UBMI.

2.2 Zhodnocení výsledků

Tato kapitola shrnuje výsledky izolací plasmidové DNA z proteinu CHR2, ASAP1, ASAP-3, ASAP-5 a K_{ir} 2.1. Úspěšnost izolací byla vyhodnocena pomocí gelové elektroforézy a transfekce. Při všech experimentech byly použity metody popsané v kapitole 2.1.

V rámci experimentální části bylo provedeno celkem 18 izolací. Přehled izolovaných plasmidů a úspěšnost jejich izolace se nachází v Tabulka 1.

Tabulka 1: Izolované plasmidy

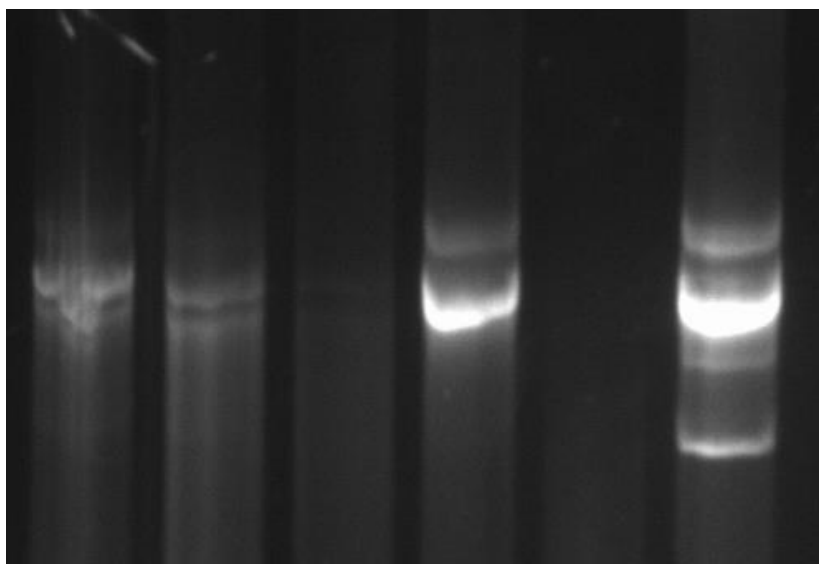
	Počet izolací	Úspěšně izolované	Úspěšnost (%)
CHR2	6	3	50
ASAP1	4	4	100
ASAP-3	2	2	100
ASAP-5	1	1	100
K_{ir} 2.1	5	4	80
Celkem	18	14	78

Tabulka 2: Tabulka koncentrací a vkládaného množství plasmidů k buňkám při transfekci

Číslo vzorku	Protein	Koncentrace pDNA [ng/μl]	Vkládané množství (1500 ng/μl) [μl]	Upravené vkládané množství [μl]
1	K _{ir} 2.1	784,39	1,91	19,1
2	CHR2	432,79	3,46	34,6
3	K _{ir} 2.1	140,54	10,67	106,7
4	CHR2	809,81	1,85	18,5
5	CHR2	594,52	2,52	2,52
6	K _{ir} 2.1	580,91	2,58	10,58
7	CHR2	602,09	2,49	2,49
8	ASAP-3	157,16	9,54	9,54
9	ASAP1	1697,92	0,88	0,88
10	ASAP-5	254,53	5,89	25,89
11	CHR2	224,53	6,68	66,8
12	CHR2	225,09	6,66	66,6
13	ASAP1	727,34	2,06	2,06
14	ASAP1	288,31	5,23	5,23
15	ASAP-3	386,31	3,88	3,88
16	K _{ir} 2.1	-	7	7
17	K _{ir} 2.1	-	7	7
18	ASAP1	-	7	7

2.2.1 Analýza gelovou elektroforézou

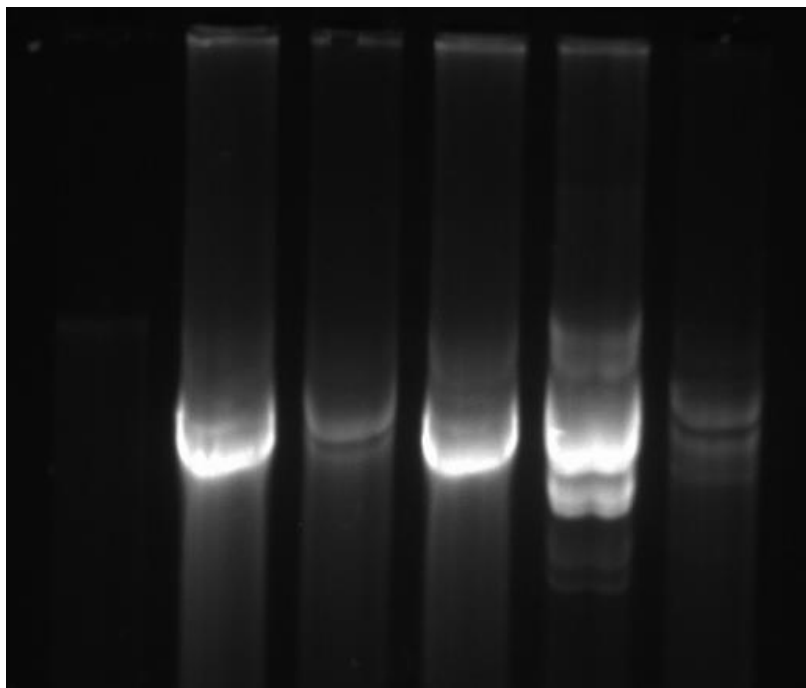
Metoda gelové elektroforézy a fragmentace vzorků byla prvním ukazatelem správnosti izolované pDNA. Předpokladem byl nález alespoň dvou bandů u každého vzorku: horní- linární forma plasmidové DNA, spodní- kruhová forma plasmidové DNA (popřípadě prostřední relaxovaná forma).



Obrázek 7: Gelová elektroforéza vzorků č. (zleva) 3, 8, 10, 11, 12, 14 (po 60ti min)

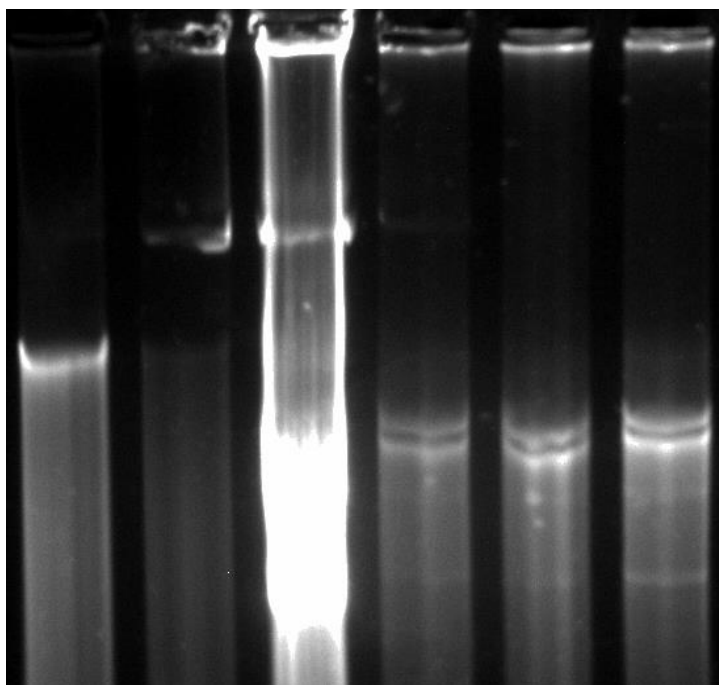
Jednotlivé vzorky byly roztřízeny dle podobné koncentrace pDNA na 3 gely, aby se předešlo rozdílné intenzitě svítivosti bandů, která je způsobena právě různou koncentrací DNA v TE pufru (čím vyšší koncentrace, tím vyšší svítivost).

Na Obrázek 7 se nachází výsledná elektroforéza vzorků 3, 8, 10, 11, 12 a 14. Na první pohled je zřejmé, že vzorky 10 (ASAP-5) a 12 (CHR2) nevykazují žádné bandy, což ovšem ještě nemusí znamenat, že se jedná o nefunkční konstrukty. U ostatních vzorků jsou viditelné dva bandy, u vzorku 14 (ASAP1) dokonce bandy tři.



Obrázek 8: Gelová elektroforéza vzorků č. (zleva) 2, 5, 6, 7, 13, 15 (po 60ti min)

Výsledná elektroforéza dalších šesti plasmidů (Obrázek 8) ukázala, že vzorek v první jamce gelu (vzorek č. 2- CHR2) bude pravděpodobně špatně vyizolován a u transfekce nebude jevit svítivost.



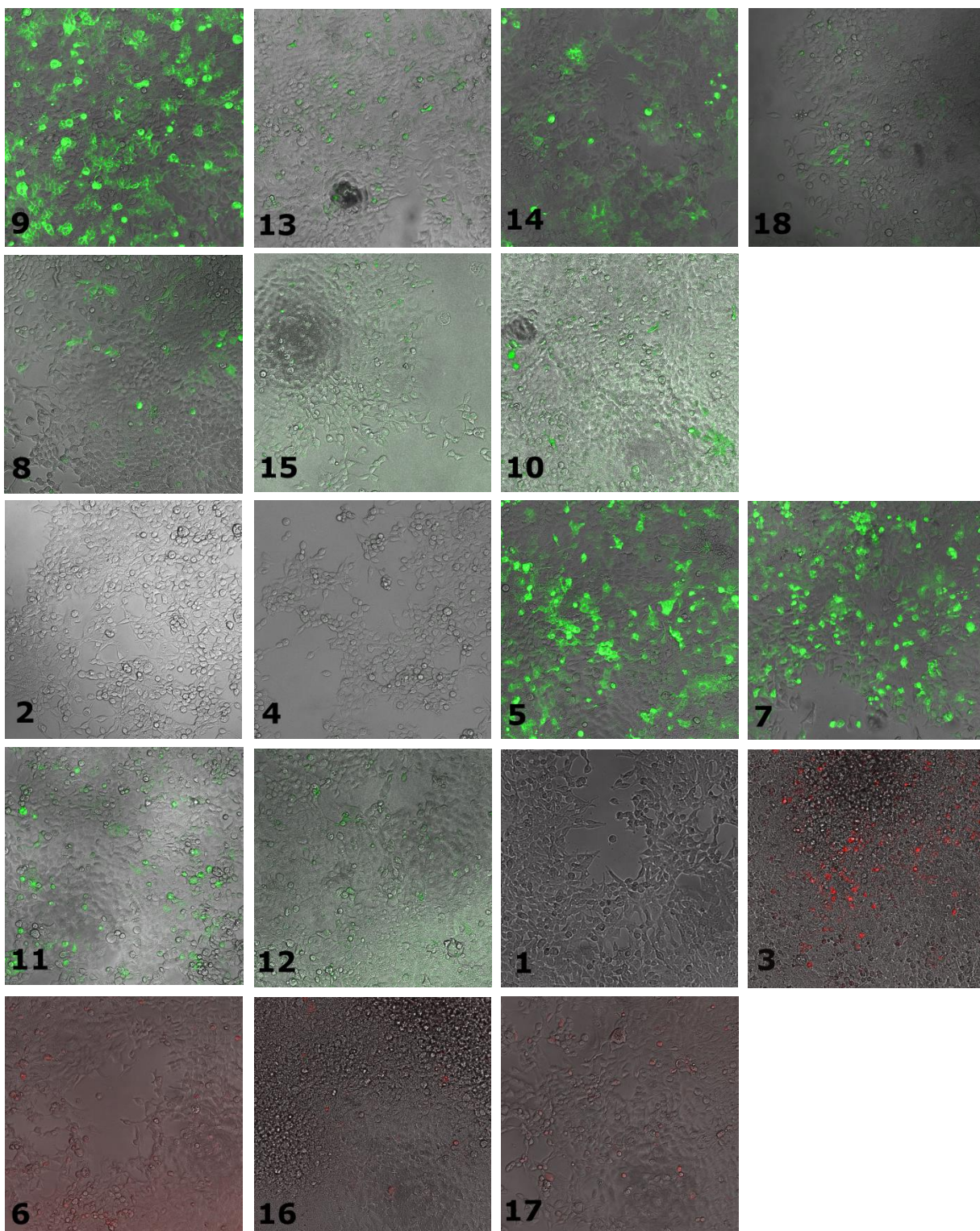
Obrázek 9: Gelová elektroforéza vzorků č. (zleva) 1, 4, 9, 16, 17, 18 (po 60ti min)

Posledních 6 vzorků se nachází na Obrázek 9, kde v prvních dvou jamkách pozorujeme pouze jeden zřetelný band, jedná se o vzorek č. 1 ($K_{ir}2.1$) a vzorek č. 4 (CHR2). Nejintenzivnější svítivost vykazuje vzorek č. 9 (ASAP1), což je vzorek s nejvyšší koncentrací plasmidové DNA ze všech izolovaných plasmidů.

2.2.2 Transfekce

Pro konečné vyhodnocení správnosti a funkčnosti vyizolované DNA byly jednotlivé vzorky transfekovány do buněčné linie HEK 293. Ve většině případů transfekce potvrdila výsledky gelové elektroforézy.

Správně izolovaná plasmidová DNA, tedy funkční membránový konstrukt, se projeví fluorescencí buněk (exprimace vloženého proteinu). Fluorescence je zajištěna pomocí fluorescenčních sond navázaných na plasmidech. Konkrétně je to fluorescenční sonda YFP (Yellow Fluorescent Protein) pro plasmidy CHR2, fluorescenční sonda GFP (Green Fluorescent Protein) pro ASAP1,-3,-5 a mCherry pro $K_{ir}2.1$. Fluorescence buněk byla zřejmá již po 24 hodinách po transfekci, optimální svítivost však buňky vykazovaly po 72 hodinách. Snímky na Obrázek 10 byly pořízeny konfokálním mikroskopem 72 hodin po transfekci buněk, snímky jsou kombinací transmisního a fluorescenčního kanálu. Čísla na jednotlivých snímcích jsou označením plasmidů.



Obrázek 10: Transfekce, vzorky č. 9, 13, 14, 18- ASAP1; vzorky č. 8, 15- ASAP-3, vzorek č. 10- ASAP-5; vzorky č. 2, 4, 5, 7, 11, 12- CHR2; vzorky č. 1, 3, 6, 16, 17- Kir 2.1 (po 72 h)

ASAP1

ASAP je jediný plasmid izolovaný se 100% úspěšností. Nejvíce fluoreskujících buněk se nachází ve vzorku č. 9, což koresponduje s faktem nejvyšší koncentrace plasmidové DNA ve vzorku. Vzorky 13, 14 a 18 obsahují fluoreskujících buněk méně, což je dáno i nižší koncentrací plasmidové DNA oproti vzorku 9.

ASAP-3 a **ASAP-5** jsou modifikované proteiny ASAP1, vzhledem k tomu, že se jedná o větší membránové konstrukty, jejich efektivita transfekce je nižší. Vzorky č. 8 a 15- ASAP-3 a vzorek č. 10- ASAP-5 také považujeme za funkční membránové konstrukty.

Channelrhodopsin-2

Tento plasmid byl vyizolován s 50ti% úspěšností. Na Obrázek 10 vzorky 2 a 4 nejeví žádnou fluorescenci, u vzorku číslo 12 buňky mají nízkou fluorescenci, ale také se tento plasmid nedá počítat za funkční. Naproti tomu vzorky číslo 5 a 7 obsahují mnoho fluoreskujících buněk a mají potenciál pro další využití. Posledním plasmidem CHR2 je vzorek 11, kde fluoreskujících buněk není mnoho, ale tento nedostatek by bylo možné dalším navýšením vkládaného objemu pDNA při transfekci kompenzovat. Svou roli při transfekci hraje také stav a kvalita dané buněčné linie.

K_{ir} 2.1

Plasmid draslíkového kanálu K_{ir} 2.1 se povedlo vyizolovat s větší úspěšností než CHR2, i když buňky jevíly podstatně menší fluorescenci. Ve vzorku číslo 1 nefluoreskuje žádná buňka, vzhledem k tomu, že šlo vůbec o první izolovaný plasmid, mohlo například dojít k nějaké chybě v procesu izolace. U vzorků č. 6, 16 a 17 pár buněk fluoreskuje, tyto plasmidy považujeme za funkční, protože je známo, že plasmidy K_{ir} 2.1 se poměrně těžko transfekují. Největší fluorescenci z těchto plasmidů má vzorek č. 3.

Závěr

Cílem této bakalářské práce byla izolace zvolených plasmidů pro jejich funkci membránových konstruktů. Na téma izolace plasmidové DNA z bakterií se zaměřením na metodu fenol-chloroformové extrakce byla provedena literární rešerše a metoda následně využita v praxi.

V teoretické části byly shrnuty základní informace o DNA, její plasmidové formě a bakteriích *E.Coli*, které v praktické části slouží jako hostitelské organismy k amplifikaci plasmidů a k jejich následné izolaci. Dále byl proveden přehled metod izolace DNA a přehled metod transfekce buněk.

Předmětem experimentální části byla izolace plasmidů CHR2, $K_{ir}2.1$. a ASAP1, ASAP-3, ASAP-5. Celkem bylo provedeno 18 experimentálních izolací. Správnost a kvalita izolace byla následně prověřena gelovou elektroforézou a chemickou transfekcí, pomocí reagentu polyethylenimin, do buněk linie HEK293. Optimální fluorescenci transfekované buňky jeví po 72 hodinách, kdy byly pořízeny snímky konfokálním mikroskopem. Množství fluoreskujících buněk souviselo s koncentrací a kvalitou izolované plasmidové DNA ve vzorku. Plasmidy ASAP1, ASAP-3 a ASAP-5 byly vyizolovány se 100% úspěšností, plasmidy $K_{ir} 2.1$ s 80% úspěšností a s 50% úspěšností plasmidy CHR2. Celková průměrná úspěšnost izolací je 78%.

Získané funkční plasmidy je možné využít pro další experimenty jako např. studium optické aktivity buněk, klidového membránového potenciálu nebo indikace depolarizace buněčné membrány.

Pro další zhodnocení kvality a výtěžnosti plasmidové DNA získané pomocí fenol-chloroformové extrakce, by bylo vhodné metodu porovnat s výsledky izolací pomocí magnetických částic či adsorpčních kolonek.

Literatura

- [1] DOBIÁŠ, Lubomír. *Úvod do buněčné a molekulární biologie*. 1.vyd. Ostrava: Ostravská univerzita 2000, 244 s. ISBN: 80-7042-791-4.
- [2] BROWN, T. A. *Klonování genů a analýza DNA*. 1.vyd. Překlad Martin Fellner. Olomouc: Univerzita Palackého 2007, 389 s. ISBN: 978-80-244-1719-6.
- [3] National Human Genom Research Institute. *Deoxyribonucleic Acid (DNA)* [online]. 2015-05-16. [cit.2015-11-20]. Dostupné z: <http://www.genome.gov/25520880>
- [4] Genetics Home Reference. *What is DNA?* [online]. 2015. [cit. 2015-10-15]. Dostupné z: <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/basics/dna>
- [5] LAB Guide. *Klonování* [online]. 2014. [cit. 2015-10-15]. Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/klonovani/>
- [6] HU, Amanda. Looks can be deceiving: the case od Escherischia coli. *The Journal of Young Invetigators* [online]. 2002. [cit.2015-10-30]. Dostupné z: <http://legacy.jyi.org/volumes/volume6/issue5/features/hu.html>
- [7] KENNETH, Todar. Pathogenic E. coli. *Todar´s online textbook of bacteriology* [online]. 2013. [cit.2015-10-28]. Dostupné z: <http://textbookofbacteriology.net/e.coli.html>
- [8] YARRIS, Lynn. E.Coli Bacteria Engineered to Eat Switchgrass and Make Transportation Fuels. *News Center* [online]. 2011-11-29. Dostupné z: <http://newscenter.lbl.gov/2011/11/29/e-coli-make-three-fuels/>
- [9] MicrobeWiki. *DH5-Alpha E.coli* [online]. 2015-12-17. [cit.2015-12-22]. Dostupné z: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/DH5-Alpha_E.coli
- [10] TAYLOR, R. G. E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic acids research*. 1993, roč. 21, č. 7.

- [11] Xiaoxiao He, Hailing Huo, Kemin Wang, Weihong Tan, Ping Gong, Jia Ge. Plasmid DNA isolation using amino-silica coated magnetic nanoparticles (ASMNPs) [online]. 2007. Dostupné z: doi: 10.1016/j.talanta.2007.04.056.
- [12] PENKA, Miroslav, TESAŘOVÁ, Eva. *Hematologie a transfuzní lékařství I.* 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s. 2011, 488 s. ISBN: 978-80-247-3459-0.
- [13] BÁRTOVÁ, Eva. Molekulární biologie. *Gelová elektroforéza* [online]. 2011. [cit.2015-11-24]. Dostupné z: http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz
- [14] Yao-Cheng Lin, Morgane Boone, Leander Meuris, Irma Lemmens, Nadine Van Roy, Arne Soete, Joke Reumers, Matthieu Moisse, Stéphane Plaisance, Radoje Drmanac, Jason Chen, Frank Speleman, Diether Lambrechts, Yves Van de Peer, Jan Tavernier, Nico Callewaert. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nature Communications* 5 [online]. 2014, č. 4767. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms5767.
- [15] SHAW, Gerry, Silas MORSE, Miguel ARARAT a Frank L. GRAHAM. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* [online]. 2002, roč. 16, č. 8, s. 869 –871. ISSN 15306860. Dostupné z: doi:10.1096/fj.01-0995fje
- [16] KIM, Tae Kyung a James H. EBERWINE. Mammalian cell transfection: The present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2010, roč. 397, č. 8, s. 3173-3178. ISSN 16182642. Dostupné z: doi: 10.1007/s0021
- [17] Celeromics. *HEK293 cells* [online]. Dostupné z: <http://www.celeromics.com/en/Support/cell-lines/Hek%20293%20cells.php>
- [18] NAGEL, Georg, Tanjef SZELLAS, Wolfram HUHNS, Suneel KATERIYA, Nona ADEISHVILI, Peter BERTHOLD, Doris OLLIG, Peter HEGEMANN a Ernst BAMBERG. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2003, roč. 100, č. 24, s. 13940–13945. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1936192100

- [19] ST-PIERRE, François, Jesse MARSHALL, Ying YANG, Yiyang GONG, Mark SCHNITZER a Michael LIN. High-fidelity optical reporting of neuronal electrical activity with an ultrafast fluorescent voltage sensor. *Nature neuroscience* [online]. 2014, roč. 17, č. 6, s. 884–9. ISSN 1546-1726. Dostupné z: doi:10.1038/nn.3709
- [20] MINOR, D L, S J MASSELING, Y N JAN a L Y JAN. Transmembrane structure of an inwardly rectifying potassium channel. *Cell* [online]. 1999, roč. 96, č. 6, s. 879–891. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(00)80597-8

Seznam zkratek

NK- nukleové kyseliny

DNA- deoxyribonukleová kyselina

RNA- ribonukleová kyselina

pDNA- plasmidová deoxyribonukleová kyselina

CHR2- channelrhodopsin-2

ASAP- activated sensor of action potentials

K_{ir} 2.1- Inwardly- Rectifying Potassium Channels

HEK293- human embryonic kidney

SDS- dodecylsulfát sodný

PEI- polyethylenimin

UBMI- Ústav biomedicínského inženýrství

Seznam příloh

PŘÍLOHA A - Izolační protokol	38
-------------------------------------	----

Příloha A

Izolační protokol

1. Krok - Chemicky kompetentní buňky

Pomůcky

- bezdetergentní sterilní skleněné a plastové nádoby (viz Postup)
- stolní OD600nm spektrofotometr
- SOB

CCMB80 buffer

- 10 mM KOAc pH 7.0 (10 ml z 1M stock/L)
- 80 mM CaCl₂·2H₂O (11.8 g/L)
- 20 mM MnCl₂·4H₂O (4.0 g/L)
- 10 mM MgCl₂·6H₂O (2.0 g/L)
- 10% glycerol (100 ml/L)
- dle potřeby SNÍŽIT pH na hodnotu 6,4 pomocí 0,1M HCl
 - zvýšení pH vysráží oxid manganičitý z roztoku obsahujícího Mn
- sterilně přefiltrovat a skladovat při 4°C
- případné ztmavnutí sraženiny není na závadu

Postup

Příprava kompetentních buněk

- 250ml SOB media nasadit 1ml příslušných buněk a nechat množit při teplotě 37°C k dosažení hodnoty absorbance 0,5
 - rozmnožování zabere přibližně 16h
 - kontrolováním teploty lze dosáhnout vyšší efektivity rozmnožování, není to ale nezbytné
 - regulováním teploty v místnosti je možné do jisté míry ovlivnit dobu procesu dle potřeby
 - zaměřit se na dosažení raději nižší než vyšší cílové absorbance
- centrifugovat při 5000ot/m a teplotě 4°C po dobu 10min v centrifugační zkumavce
 - centrifugační zkumavky s plochým dnem umožňují snazší resuspendaci buněk

- většinou je jednodušší resuspendovat pelet v menším množství pufru, až poté doplnit na potřebný objem
- odstranit supernatant pomalým vylitím a zbylý vypipetovat
- opatrně resuspendovat pelet v 80ml ledově vychlazeného pufru CCMB80
- inkubovat na ledu 20 minut
- centrifugovat znovu při 4°C a odstranit supernatant jak je popsáno výše
- resuspendovat v 10ml ledově vychlazeného pufru CCMB80
- otestovat absorbancí směsi 200μl SOC a 50μl resuspendovaných buněk
- přidat zchlazený CCMB80 k získání konečné absorbance 1.0 - 1.5 v tomto testu
- rozdělit do vychlazených 2ml zkumavek se závitkem nebo do vychlazených 50μl mikrotitračních plátů
- uschovat při -80°C libovolně dlouho
 - bleskové zmrazení se nezdá být nezbytné
- otestovat kompetenci (viz níže)
- rozmrazování a zmrazování částečně použitých buněk dramaticky snižuje efektivnost transformace - asi trojnásobně při prvním a zhruba šestinásobně při následujících rozmrazovacích/zmrazovacích cyklech

2. Krok - Transformace

Postup:

1. smíchat 50 - 100μl buněk s plasmidovou DNA
2. mrazit 10 - 20min
3. tepelný šok 42°C po dobu 1min
4. přidat 1ml LB, SOB nebo SOC media a přenést bakteriální suspenzi do bakteriologické baňky
5. třepat 20 - 60min při 37°C
6. rozetřít 20 - 200μl suspenze na agarové pláty

3. Krok – Izolace

- inkubace E.Coli při 37°C a protřepáváním ve 100 ml média s antibiotiky 12h
- centrifugovat bakterie 5 min při 4.000 rpm

- resuspendovat pelet ve 4ml roztoku GET rozvortexováním
- přidat 8ml alkalického SDS a protřepat dokud nebude roztok čistý (ne déle než 3 minuty)
- přidat 6ml roztoku KAc a protřepat
- inkubovat v mrazu -10°C
- centrifugovat 10min při maximální rychlosti (4°C)
- transferovat supernatant do nové zkumavky
- přidat 16ml isopropanolu
- inkubovat při pokojové teplotě 15 min
- centrifugovat 10min při maximální rychlosti
- promýt pelet 1ml 70% etanolu a nechat 2-5min schnout na vzduchu
- resuspendovat v 800 µl TE pufru a transferovat do 2ml zkumavek (20min 65°C)
- přidat 0,5µl RNaseA [20mg/ml] a inkubovat při 37°C 30min
- přidat 300µl fenol:chloroform:isoamyl alkohol
- přidat 200µl 1M Tris (base)
- přidat 100µl 3M NaAc
- vortexovat dokud nedojde ke smísení
- centrifugovat na nejvyšší rychlosti 3 min
- pipetovat vodnou fázi (vrchní) do nové 2 ml zkumavky
- opakovat fenol:chloroform:isoamyl alkohol extrakci
- odstranit fenol 500µl roztoku chloroform:isoamyl alkohol
- vortexovat a centrifugovat 3 min při maximální rychlosti
- opakovat extrakci dokud nebude mezifáze čistá bez nějakých kontaminant (2-4x)
- vysrážet s 1000µl isopropanolu (30min pokojová teplota)
- centrifugovat 10min při maximální rychlosti
- vylít supernatant
- promýt pelet 700µl EtOH 70%
- nechat vzduchem oschnout pelet
- rozpustit v TE (400-1000µl)